

## 6. アイソザイムによる病態解析\*

— LDH アイソザイムを中心として —

菅野 剛 史\*\*

病態の診断を目的として酵素の多様性が電気泳動分析により解析されたのは、アイソザイムの命名以前のことである<sup>1)</sup>。1950年代に、損傷臓器の推定に血清中に臓器より遊出した酵素群の測定が用いられるようになると、血清での酵素プロファイルは、損傷臓器の推定に重要な役割りを示した。そのころ乳酸脱水素酵素 (EC, 1. 1. 1. 27, LDH) は血清中で多様性が認められること、かつ白血病などの特定の疾患でその中の特定の分画が増加することを報告したのは Vesell と Bearn であった<sup>1)</sup>。その後、数多くの研究者によって、臨床的には遊出酵素による臓器診断をより確実にするという観点より、血清のアイソザイムパターンと、各臓器のアイソザイムパターンの対比がなされ、臨床診断へのアイソザイムの応用という一つの目的は達せられていった。

しかし電気泳動分析を中心として、数多くの患者試料を対象とした血清のアイソザイム分析がなされていく中で、遊出酵素による臓器診断の域を越えて興味ある症例が経験されていくことになる。ここでは、病態の診断、解析を対象として LDH アイソザイムの分析がどのようになされているかをいま一度振り返るとともに、診断という観点からは誤診の要因ともなる酵素結合性免疫グロブリン、遺伝性変異についても一部触れながら、LDH アイソザイムの臨床的応用についてまとめることとする。

## I. 方法及び試料

LDH の活性測定は Wróblewski, LaDue の方法<sup>2)</sup> に準拠した。Aspartate aminotransferase (EC, 2. 6. 1. 1, AST) は Henry の条件に従い<sup>3)</sup> 日本電子製, JCA-H-6-R にて連続計測した。LDH アイソザイム

の分画はセロゲル膜を用いた塩谷らの方法に従い<sup>4)</sup>、分子サイズの検索には薄層ゲル濾過法<sup>5)</sup>、免疫グロブリン (免疫 glob) との結合には、酵素免疫電気泳動<sup>6)</sup>、免疫固定法<sup>7)</sup> を用いた。

用いた試料は血清が中心であるが、遺伝性変異の解析には赤血球を試料とした。また臓器中の LDH アイソザイムは術后摘出された臓器の一部で健常部をホモジナイズし、105,000×G 上清をそのまま分析対象とした。

## II. 結果および考察

## 1. LDH アイソザイムの診断への応用

血清中の遊出酵素の診断への応用、ならびに血清中の酵素レベルを定める因子として、イ) 臓器中の酵素プロファイル (ここではアイソザイムパターン)、ロ) 臓器中の酵素含量、ハ) 血清での各アイソザイムの半減期が問題となる。ここでは、これらの問題をもう一度明らかにした。

## 1-1. 主要な臓器での LDH 含量とそのアイソザイムパターン

Table 1 に臨床的に評価の対象となる主要臓器の LDH 含量, LDH/AST 比, 主なアイソザイム分画の成分をまとめた。

LDH 含量は 105,000×G 上清の蛋白当りの活性として表示したが、ほぼ臓器当りの活性を反映していると思われる。

アイソザイム I, II 分画は、心筋、赤血球、腎に豊富であるが、赤血球では LDH/AST 比が高く、心筋、腎において低い、特徴のあるのは、肝であり、正常の肝では V 分画が多く、かつ V/IV 比は 5 を越している。一方、胎児肝、肝癌組織中での V/IV 比は低

\* Diagnostic use of isozymes — With an emphasis on lactate dehydrogenase isozyme —

\*\* Takashi Kanno, 浜松医科大学附属病院検査部。

Table 1. LDH activities, LDH/AST ratio and dominant isoenzymes in various tissues.

Tissues	LDH activity (U/g of protein)	LDH/AST	Dominant isoenzymes
Liver	267	0.1—0.2	V (V/IV > 5)
Heart muscle	8,920	2.7—3.9	I & II
Skeletal muscle	521	3.1—4.5	III, IV & V
Lung	1,996	11.9	IV & V
Kidney	3,145	8.4	I & II
Erythrocyte	7,350	48.7—59.6	I & II
Granulocytes	800	32.1	III, IV & V
Lymphocytes	2,880	17.8—26.7	II, III & IV
Fetal liver	1,418	2.0—2.5	IV & V (V/IV < 5)
Hepatoma	723	0.9—1.8	IV & V

く、肝癌組織の embolization 治療の効果の判定に重要である。

骨格筋は、特定のアイソザイムパターンを呈しない。骨格筋の部位により著しく異なるのが常である。その中でも特徴のあるのは腹直筋、横隔膜などであり、これらの筋では V 型が約 90% を占める。

比活性で高値を示すのは、心筋、赤血球であり、わずかの心筋の障害、赤血球の溶血により LDH 活性が著しく上昇する理由が明らかとなる。また肝ではその比活性は低く、LDH よりも AST, ALT がより評価の対象となった理由も明らかである。

#### 1-2. 血清中での LDH 各アイソザイムのみかけの半減期

血清中の酵素活性のレベルを定める重要な因子の一つに血清中でのみかけの活性値の半減期がある。一方この半減期は、損傷臓器の時期、予後を推定するにも重要な要素となる。

Table 2 に LDH の各アイソザイムの見かけの半減期を示した。これらは、I, II, III 型については心筋梗塞の症例、IV, V 型は、肝の一過性の虚血などによる症例での実測値より求めたものである。I > II > III > IV > V であり、V 型の半減期は最も短かく、肝癌の embolization などではその効果判定に重要なマーカーとなる。

一方 I, II 型は半減期が長いことから、心筋の虚血発作をさかのぼって推定する場合に有効である。

また血清中のアイソザイム分画は、この半減期の差

Table 2. Apparent elimination rates of plasma LDH.

Isoenzymes	Half-life (hours)
I	70—80
II	60—75
III	30—40
IV	10—15
V	5—10

により臓器よりの持続的な遊出に際しては、臓器のパターンが修飾を受けることになる。一般に白血病などで II > III でこれらの分画の上昇を伴うが、白血病細胞でのアイソザイム分画は II ≒ III ≒ IV の分画を呈する。半減期の差により修飾を受けたことが判明する<sup>9)</sup>。

#### 1-3. 由来臓器推定のためのアイソザイム分画

Table 3 に臓器損傷に伴う血清 LDH アイソザイム分画のパターンを示した。一般的に評価の対象となる臓器は、臓器内の LDH 含量より赤血球、心筋、骨格筋が容易に評価され、また臓器損傷の大きさより肝が対象となりうる。Table 3 にまとめたのは、損傷部位と、血清中のアイソザイムパターンの変化の主要な分画である。

赤血球由来の LDH の増加は、血管内溶血（機械的な microthrombosis の部位での溶血、心臓の弁置換後の溶血などを含む）、溶血性貧血、夜間発作性色素尿

Table 3. Organ specific alterations of lactate dehydrogenase isoenzymes.

Organs	Diseases	Plasma LDH isoenzymes	LDH/AST
Erythrocyte	Megaloblastic anemia Hemolytic anemia PNH, Intravascular hemolysis	I > II (LDH > 2,000 unit) Haptoglobin decreased	50 <
Heart muscle	Myocardial infarction	I > II increased	20 <
Skeletal muscle	Myositis Muscle dystrophy	Undefined II, III increasesd	10-25 10-25
Liver	Acute hepatitis Chr. hepatitis	Marked increases of V (V/IV > 4) V increased (V/IV < 4)	< 4 < 4
Kidney	Renal infarction	I, II increased	10-20

(PNH), 悪性貧血 (megaloblastic anemia) などで観察される。この中で、一過性の溶血によるアイソザイムパターンでは I = II で I, II 型が上昇するが、持続性の溶血では、II 型の半減期は I 型より短かく、従って I > II のパターンで I, II 型の上昇が観察される。また赤血球由来 LDH の増加では、LDH/AST 比がほぼ 50 以上であるのが特徴であり、悪性貧血、溶血性貧血では、LDH のレベルが非常に高い例が多い。

心筋の障害 (最も多いのが心筋梗塞) でも、LDH は上昇し、アイソザイム分画は I, II 型の増加として観察される。しかし AST が上昇し、LDH/AST 比は 20-50 位の間で観察される。この場合に I, II 型は半減期が長いので、心筋梗塞の発作時は CK などの酵素が有利であり、LDH は数日をさかのぼる場合に有効である。

骨格筋由来の LDH アイソザイム分画は、一般には評価の対象とするのは困難である。M サブユニットの豊富な臓器として考えられるが、V 型が 95% を占める筋は腹直筋と、横隔膜などである。損傷筋によって多少異なるが、一般には II-IV, V 型までの上昇という分画パターンをとるものが多い。

特定のアイソザイム分画を呈する筋疾患の代表は筋ジストロフィー症であり、II, III 型の上昇、かつ LDH/AST 比は約 10-20 を示す。

肝由来酵素の評価に LDH V は、半減期が短いために有意義である。したがって急性肝炎にては著しい V 型の上昇として観察され、かつ V/IV が 4 を越えて高値である。慢性の時期では、肝よりの酵素の

遊出がごくわずかでもあれば V > IV を呈するし、また半減期の関係で特徴的な軽度の酵素遊出では V/IV 比は 4 を越えない。

腎由来の症例はごく稀である。血尿を伴った疼痛の発作と、I, II 型上昇の LDH を観察したならば、尿路結石よりは腎梗塞を考えるべきである。

#### 1-4. 腫瘍に由来すると思われる LDH の上昇とアイソザイム分画の変化

Leukemia を始めとしていくつかの腫瘍の患者血清中での LDH の上昇とアイソザイム分画の特徴がまとめられている。Table 4 にこれらをまとめた。最も確実なのは LDH の上昇かつ LDH/AST 比の高い II, III 型上昇の分画パターンであり、その例は白血病に多い。また悪性リンパ腫、胃癌などの消化器癌にて同様のパターンを呈する。しかし II, III 型上昇から、これら悪性腫瘍を診断することは予測率は低く LDH/AST 比、LDH 活性値を組合せて始めて予測率は高くなる。一般に LDH/AST 比が 100 を越えるような症例が存在したならば、90% 以上の予測率で malignancy を疑ってよい。

I, II 型上昇のパターンを呈する悪性腫瘍の代表は睾丸腫瘍、奇型腫などである。これらの例でも LDH/AST 比は高値をとる例は多い。

LDH の上昇、LDH/AST 比の上昇は伴わないが、II, III 型間に subband を呈する腫瘍が存在する。星型細胞腫であり、稀であるが診断は容易である。

その他、単独の臓器由来では説明されないような LDH アイソザイムパターンを示す悪性腫瘍例は多数存在する。しかし腫瘍の種類によって特定のパターン

Table 4. Alterations in malignancy.

Diseases	Plasma LDH isoenzymes	LDH/AST
Leukemia	II & III increased	40
Malignant lymphoma	II & III increased	20-45
Cervical carcinoma	V increased	10-20
Teratoma	I & II increased	10-100
Astrocytoma	Additional band between II & III	10-50
Gastric cancer	II & III increased	10-20

を示さず、アイソザイム分画よりの腫瘍の診断は危険である。

## 2. 遺伝性変異

LDHにおいてはA<sup>9)</sup>、およびB<sup>10)</sup>サブユニット欠損症が報告されているほかに、Bサブユニットの不活性化型変異<sup>11)</sup>、A'<sup>12)</sup>、B'<sup>13)</sup>変異と数多くの変異が報告されている。病態解析という観点からは、サブユニット欠損症、また誤診につながる pitfall としてはサブユニット欠損のヘテロ接合体が挙げられる。

### 2-1. Aサブユニット欠損症

我が国において2家系が見出されている<sup>9,14)</sup>。いづれも、虚血下運動負荷試験で、乳酸の上昇を認めないが糖原病と異なり、ピルビン酸の著しい上昇が観察される。

一般に激しい運動後に筋の著しい硬直とミオグロビン尿を認めるが、女性では激しい運動を諦めるのでミオグロビン尿まで伴うことはなく無症状に経過することもある。ミオグロビン尿によって惹起される急性腎不全を管理すれば一般的に生活に支障はないものとする。しかし、急性肝炎、筋障害などでLDHの上昇を伴わないことが期待されるので誤診の原因になる危険性がある。

### 2-2. サブユニット欠損のヘテロ接合体

サブユニット欠損のヘテロ接合体(キャリアー)の頻度は、前川らによって静岡、浜松を中心に実施され、Aサブユニットにおいて0.185%、Bサブユニットにおいて0.159%と報告されている<sup>15)</sup>。約550人、650人に対して一人の割合であり、かなりの高頻度である。浜松医大での患者群を用いたスクリーニングにおいても、血清低LDH活性者を対象としてBサブユニットヘテロ家系は13家系にも達している。B、またはAのヘテロ接合体は、臓器損傷においても期待された酵素遊出を伴わない。Bサブユニット欠損の家系では心筋梗

塞時に、また血管内溶血などのような赤血球由来のLDHを評価する際にはLDHの増加は期待される医師の誤診をまねくおそれがある。同様にAサブユニットの欠損家系では肝障害の診断に対して誤解され易い。

これらのキャリアーを確診するために、現在までに浜松医大において経験されたBサブユニット欠損のヘテロ体23家系35例、Aサブユニット欠損のヘテロ体15家系25例より、赤血球内のサブユニット比A/Bを算出しその分布、正常範囲を算出した。Table 5にこれをまとめた。Bサブユニット欠損のヘテロ体群では、明らかに血清LDHレベルは健常群に比べて低いが、195~272単位の間で重複が認められる。我々が設定した低LDHスクリーニングの検査室内基準は初めは125単位であった。この値は、ヘテロ群の約 $\frac{1}{3}$ を含むにすぎず、 $\frac{2}{3}$ 以上の患者群は検出されていないことを示している。検査データを用いた遺伝性変異のスクリーニングの限界を示すものであろう。また赤血球A/B比においては2.30をcut off値として重複はわずかであり、赤血球A/B比が効率のよい方法であることが示された。

Aサブユニット欠損ヘテロ体群では、血清のLDH値は検索を初める対象とはならない。しかし赤血球内のA/B比では3.50をcut off値としてやはり有効であることが示された。

## 3. 酵素結合性免疫グロブリンの存在する症例

酵素結合性免疫globは、酵素と結合する自己抗体とも考えられている。一般に、この存在は特定の病態を示すのではなく、背景に免疫異常の存在が考えられるにすぎない。

しかしLDH結合性免疫globの例は、大部分がLDHアイソザイムの解析によって見出された症例である。また全国的なLDH結合性免疫globの集計によると、

Table 5. Reference parameters for the detection of LDH abnormalities.

Groups	Plasma LDH	RBC A/B ratio
Normal control	195—336	2.30—3.50
Heterozygous individuals of B-subunit deficiency	57—272	1.46—2.28
Heterozygous individuals of A-subunit deficiency	254—561	3.49—6.04

H鎖のIgG型のは、慢性肝炎例で頻度が高い。これらの症例について今後どのような問題が提起されるかは今後の課題としても、病態診断上に二つの問題点を投げかけていることは事実である。その一つは、原因不明の高LDH症として、肝機能検査を含めた数多くの精査が為されている症例が多いこと、つまり診断のためのpitfallになっていること、二つは、免疫globと思われる失治因子が存在する症例のあることで<sup>16)</sup>、これは逆に低LDH血症の中に含まれるがまたは見かけの低値を示すpitfallになっている可能性が高いことである。これからの課題としても、日常検査の中でアイソザイム分析で、不可解な例へのとり組みが重要であることを示している。

### III. ま と め

Fig.1にLDHアイソザイム分画による病態解析の主要なflowをまとめた。

一般的に酵素活性の異常は、遊出酵素群においては高値に対してのみ注目されるのが常であった。しかし低値を示す例でも、アイソザイム分析か、または赤血球を用いたA/B比を求めることは遺伝性変異の解析に重要である。

一方LDH活性がまったく正常であっても他の酵素活性との論理的な関係が成立しないような例でも、アイソザイム分画は必須である。酵素プロファイルの評価に定量的な観察が必要であることを示している。

アイソザイム分画によって臓器特異性の高いパターンか、または腫瘍などの存在を疑うパターンを得た場合は更に詳細な解析が必要とされよう。

LDHアイソザイムによる病態の解析は、他の酵素の多様性の解析と病態との関連を明らかにする上で一つの確立されたハイウェイである。LDHアイソザイムにおける例を足がかりとして多くの酵素の多様性の解

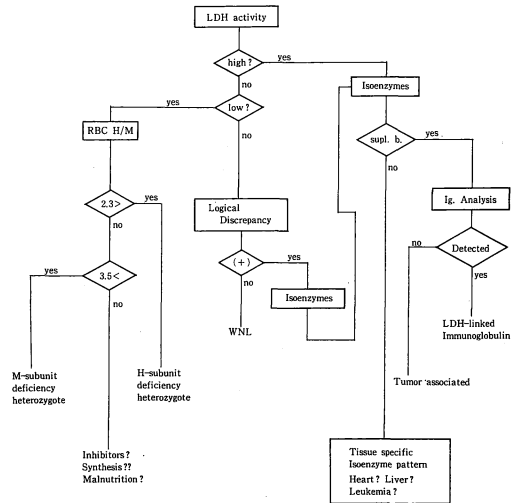


Fig.1. Flow chart for the discrimination of LDH abnormalities.

析が病態のより詳細な解析のみならず病因の解明へ連なることを期待して結びたい。

謝辞、本研究の1部は、厚生省酵素障害調査研究費、および加藤記念生理学研究所助成によって援助された。

### 文 献

- 1) Vesell, E.S. and Bearn A.G.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **94**: 96, 1957.
- 2) Wróblewski, F. and LaDue, J.S.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **90**: 210, 1955.
- 3) Henry, R.J. et al.: Amer. J. Clin. Pathol., **34**: 381, 1960.
- 4) 塩谷実枝子他: 臨床病理, **19**: 467, 1971.
- 5) Johansson, B.G. and Rymo, L.: Acta

(242) 生物物理化学

- Chem. Scand., 16:2067, 1962.
- 6) 杉田 収, 屋形 稔: 生物物理化学, 27: 299, 1983.
  - 7) 須藤加代子: 生物物理化学, 27: 305, 1983.
  - 8) 菅野剛史: 臨床検査 Mook, No.11: 12, 1982.
  - 9) Kanno, T. et al.: Clin. Chim. Acta, 108: 267, 1980.
  - 10) Kitamura, M. et al.: Clin. Chim. Acta, 34: 419, 1971.
  - 11) Tanis, R.J. et al.: Amer. J. Hum. Genet., 29: 419, 1977.
  - 12) 菅野剛史他: 医学のあゆみ, 87: 621, 1973.
  - 13) 嵯峨実枝子: 生物物理化学, 21: 187, 1977.
  - 14) 前川真人: 臨床病理 32, (補): 57: 1984.
  - 15) Maekawa, M. et al.: Amer J. Hum. Genet., in press.
  - 16) Gray, G. et al.: Clin. Chem. 30: 11, 1984.